

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
**Image Problem Mailbox.**

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-243997

(43)Date of publication of application : 14.09.1999

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68

C12N 15/09

G01N 33/50

G01N 33/566

(21)Application number : 10-053099

(71)Applicant : HITACHI LTD

(22)Date of filing : 05.03.1998

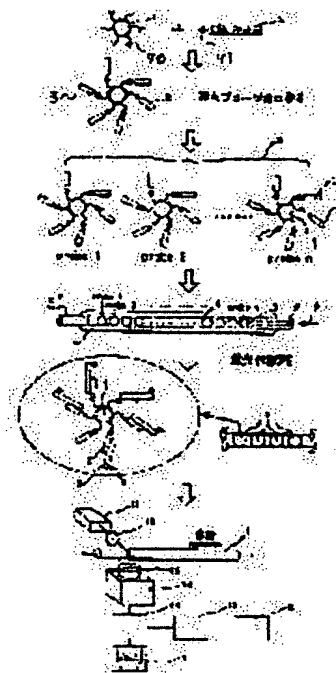
(72)Inventor : KANBARA HIDEKI  
OKANO KAZUNOBU

## (54) DNA PROBE ARRAY

## (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a probe array for detecting many kinds of DNAs by immobilizing many kinds of arbitrary DNA probes.

**SOLUTION:** The probe array 4 obtained by arranging particles (probe particles) 1 having various probes 2 immobilized thereon in a constant order is used. The probe array 4 obtained by arranging the various particles 1 always in a constant order is made by arranging plural thin tubes or grooves filled with the probe particles in parallel to each other and subsequently individually injecting the particles from the thin tubes or grooves into another fine tube or groove. The many kinds of probes are thus bound to the particles having different diameters and enable the simultaneous measurement of many kinds of fluorescent light-labeled DNAs. Thereby, the array having various kinds of the DNA probes immobilized thereon can simply be prepared.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japanese Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-243997

(43)公開日 平成11年(1999) 9月14日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

A

C 1 2 N 15/09

G 0 1 N 33/50

P

G 0 1 N 33/50

33/566

33/566

C 1 2 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数27 O L (全 11 頁)

(21)出願番号

特願平10-53099

(22)出願日

平成10年(1998) 3月5日

(71)出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72)発明者 神原 秀記

東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

(72)発明者 岡野 和宣

東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

(74)代理人 弁理士 小川 勝男

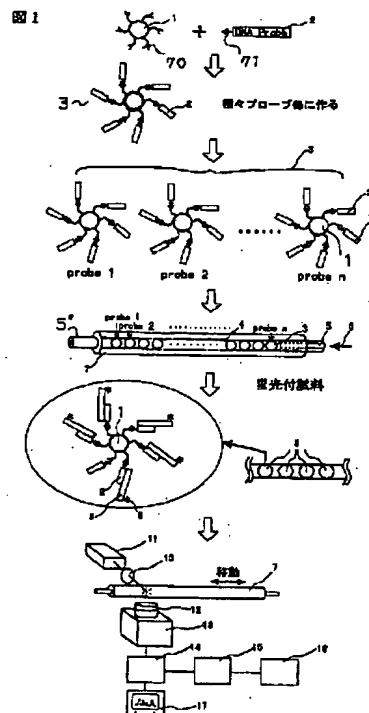
(54)【発明の名称】 DNAプローブアレー

(57)【要約】

【課題】 任意のDNAプローブを多種類固定した多種類のDNA検出用のプローブアレーを提供する。

【解決手段】 種々のプローブ2を固定した粒子(プローブ粒子)1を一定の順序で整列させたプローブアレー4を用いる。各プローブ粒子を充填した細管又は溝を複数本並列に並べ、各細管又は溝から各々粒子の1個ずつを、他の細管又は溝に注入して、種々のプローブ粒子1を常に一定の順序で整列させたプローブアレー4を作成する。粒径の異なる粒子に多種のプローブを結合して、多種類の蛍光標識DNAを同時計測する。

【効果】 多種類のDNAプローブを固定したアレーが簡単に調製できる。



**【特許請求の範囲】**

【請求項 1】異なる検査対象とそれぞれ結合可能なプローブを固定した粒子を複数並べ多項目検査を行なうプローブアレー。

【請求項 2】請求項 1 に記載のプローブアレーに於いて、前記各プローブを保持した前記粒子が予め決められた順序でライン状に並べられ、前記順序又は前記並べられた位置と前記粒子に固定された前記プローブの種類が対応づけられているプローブアレー。

【請求項 3】請求項 1 に記載のプローブアレーに於いて、前記各プローブを保持した前記粒子は、前記粒子の持つ特徴と前記プローブの種類が対応づけられていることを特徴とするプローブアレー。

【請求項 4】請求項 1 又は請求項 3 に記載のプローブアレーに於いて、前記各プローブを保持した前記粒子のサイズ又は形状と、前記粒子の表面に固定された前記プローブの種類が対応づけられていることを特徴とするプローブアレー。

【請求項 5】請求項 1 又は請求項 3 に記載のプローブアレーに於いて、前記各プローブを保持した前記粒子は、保持した前記プローブの種類に応じて異なる色素又は蛍光体で標識されていることを特徴とするプローブアレー。

【請求項 6】請求項 3 から請求項 5 の何れかに記載のプローブアレーに於いて、前記プローブを 2 次元平面上に 1 層に並べたことを特徴とするプローブアレー。

【請求項 7】請求項 3 から請求項 5 の何れかに記載のプローブアレーに於いて、前記プローブを 1 次元に並べたことを特徴とするプローブアレー。

【請求項 8】請求項 3 から請求項 5 の何れかに記載のプローブアレーに於いて、前記プローブを透明な窓を持つ容器内に保持したことを特長とするプローブアレー。

【請求項 9】請求項 1 から請求項 5 の何れかに記載のプローブアレーに於いて、前記プローブを保持した前記粒子を、毛細管内に保持したことを特徴とするプローブアレー。

【請求項 10】請求項 1 から請求項 5 の何れかに記載のプローブアレーに於いて、前記プローブを保持した前記粒子を、固体平面に形成された溝又は 2 枚の平面の間に形成された溝に保持されることを特徴とするプローブアレー。

【請求項 11】請求項 1 から請求項 5 の何れかに記載のプローブアレーに於いて、前記プローブを保持した前記粒子を複数の毛細管内に保持した前記複数の毛細管を複数個並べるか、又は前記プローブを保持した前記粒子を平面に設けた溝に保持して、前記プローブを保持した前記粒子を 2 次元に配列したことを特徴とするプローブアレー。

【請求項 12】請求項 1 から請求項 7 の何れかに記載のプローブアレーに於いて、前記プローブを保持した前記

粒子をゲル状物質の中に保持したことを特徴とするプローブアレー。

【請求項 13】粒子の表面にプローブを固定する工程と、前記プローブが固定された複数の前記粒子を配列する工程とを有するプローブアレーの製造方法。

【請求項 14】粒子の表面にプローブを固定する工程と、前記プローブが固定された複数の前記粒子を混合して平面上に配列する工程とを有し、前記粒子に固定された前記プローブの種類を粒子の形状、サイズ、又は前記粒子を標識する蛍光体により識別することを特徴とするプローブアレーの製造方法。

【請求項 15】請求項 12 に記載のプローブアレーの製造方法に於いて、前記粒子に固定された前記プローブの種類により、予め定められた順序で粒子を直線上に並べたことを特徴とするプローブアレーの製造方法。

【請求項 16】請求項 14 に記載のプローブアレーの製造方法に於いて、前記プローブを固定した前記粒子を、前記プローブの種類毎に異なる粒子溜に保持し、毛細管又は溝を通じて前記粒子を配列するための溝に 1 つずつ供給して配列させ、該配列を保持してプローブアレーホルダーに移送してプローブアレーを作成することを特徴とするプローブアレーの製造方法。

【請求項 17】請求項 16 に記載のプローブアレーの製造方法に於いて、前記粒子溜から前記粒子を配列するための前記溝、又は前記プローブアレーホルダーへの移送を電気的な力により行なうことを特徴とするプローブアレーの製造方法。

【請求項 18】請求項 16 に記載のプローブアレーの製造方法に於いて、前記粒子溜から前記粒子を配列するための前記溝、又は前記プローブアレーホルダーへの移送を溶液の流れを用いて行なうことを特徴とするプローブアレーの製造方法。

【請求項 19】請求項 14 から請求項 17 の何れかに記載のプローブアレーの製造方法に於いて、前記プローブを固定した前記粒子を移送するための毛細管又は溝を複数個用いて、異なる前記プローブがそれぞれ固定された複数の前記粒子を同時に前記粒子を配列するための溝又はプローブアレーホルダーに移送することを特徴とするプローブアレーの製造方法。

【請求項 20】粒子の表面に保持されたプローブに結合する検査対象を検出する方法に於いて、前記検査対象を蛍光体又は燐光物質で標識する工程と、前記粒子に光を照射して発する蛍光又は燐光を光学的に検出する工程とを有することを特徴とする方法。

【請求項 21】請求項 20 に記載の方法に於いて、前記粒子が配列した直線に沿って、前記光を発する光源とアレーセンサーをスキャンして、前記粒子が配列する位置毎に前記蛍光又は燐光を検出することを特徴とする方法。

【請求項 22】請求項 20 に記載の方法に於いて、前記粒子が配列した直線に沿って、前記光を照射して、前記粒

子が配列する位置毎に前記蛍光又は燐光を検出することを特徴とする方法。

【請求項 2 3】請求項 2 0 記載の方法に於いて、前記光の照射により得られる前記各粒子による光の散乱画像と、前記粒子に固定された前記プローブに結合した前記検査対象から発する蛍光とを検出し、前記粒子の形状又は前記粒子を標識する蛍光体から発する蛍光と、前記検査対象から発する蛍光又は燐光を検出し、前記各プローブに結合した前記検査対象の量を求めることを特徴とする方法。

【請求項 2 4】請求項 2 0 記載の方法に於いて、前記粒子をフローさせながら検出することを特徴とする方法。

【請求項 2 5】請求項 2 0 記載の方法に於いて、前記粒子に固定された前記プローブに結合した前記検査対象を蛍光画像として計測することを特徴とする方法。

【請求項 2 6】請求項 2 0 記載の方法に於いて、前記粒子を粒子画像として計測することを特徴とする方法。

【請求項 2 7】粒子の表面にプローブを固定する第 1 の工程と、前記プローブが固定された複数の前記粒子を群に分けて固体表面の各区画に配列する第 2 の工程と、前記各位区画に於いて前記粒子に固定された前記プローブと検査対象とを反応させる第 3 の工程と有し、前記第 3 の工程が行なわれる前記各区画での前記粒子の分布状態と、前記第 1 の工程での前記粒子の分布状態が異なることを特徴とするプローブアレーの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、検出対象を DNA、RNA、及びタンパク質として種々の検査項目を 1 度に検査するプローブアレーに関し、特に、最近注目を集めている DNA 検査用の DNA アレーに関する。

【0002】

【従来の技術】ゲノム計画の進展とともに DNA レベルで生体を理解し、病気の診断や生命現象の理解をしようとする動きが活発化してきた。生命現象の理解や遺伝子の働きを調べるには遺伝子の発現状況を調べることが有効である。この遺伝子の発現状況を調べる有力な方法として、固体表面上に数多くの DNA プローブを種類毎に区分けして固定した DNA プローブアレー、又は DNA チップが用いられ始めている。このチップを作るには、光化学反応と半導体工業で広く使用されるリソグラフィを用いて区画された多数のセルに、設計された配列のオリゴマーを 1 塩基ずつ合成して行く方法 (Science 251、767-773 (1991))、又は DNA プローブを各区画に 1 つ 1 つ植え込んでいく方法等がある。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】従来技術では、DNA プローブアレー、又は DNA チップの作成の何れの方法も制作に手間と時間がかかり、製作費が高価になる難点

がある。特に、プローブアレー (プローブの配列) が高密度であり微細な部分からできていると製作は一層手間と時間のかかるという難点がある。また、使用者が簡単に作れない不便さもある。プローブアレーが粗に配列する場合には、製作する上では楽になるが、全体として検出反応に要する体積、従ってサンプル量が多くなり、計測の面でも時間がかかったり、高感度が得られない等の問題がある。

【0004】本発明は上記の難点を解決するためになされたもので、本発明の目的は、簡単に望む DNA プローブアレー (DNA プローブの配列) を密集した状態で作ることができ、製造コストも安価な方法を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために本発明では、各プローブを保持した固体を移動できる様に微粒子で構成し、微粒子をまばらに配列させた後に移動させ、密集構造のプローブアレーを作製する。まず、種々の DNA プローブを合成して用意する。これらの DNA プローブをプローブの種類毎に微粒子の表面に結合させる。固体表面への DNA プローブの固定は、ビオチンとアビジンの結合を利用する方法、Au (金) 表面に SH 基を介して固定する方法 (Biophysical Journal 71、1079-1086 (1996))、ガラス表面に固定する方法 (Analytical Biochemistry 247、96-101 (1997))、ガラス表面に塗布したアクリルアミドゲルのエレメントマトリックスに固定する方法 (Proc Natl. Acad. Sci. USA 93、4913-4918 (1996)) 等を利用して、簡単に固体表面に多量の DNA プローブを固定できる。

【0006】DNA プローブを表面にそれぞれ保持した種々の微粒子を、検査用のホルダーに DNA プローブの種類毎に決められた順序で入れ、又は固体表面に種類毎に一定の順序で配列させて固定してプローブアレーを構成する。微粒子は球状でありサイズは用途にもよるが、直径数  $\mu\text{m}$  から 1 mm である。微粒子は、用途によっては、角形、円盤形等を使用しても良い。通常の検査には直径 0.1-0.2 mm の球形の微粒子が使いやすい。

【0007】溶媒と共にプローブを保持した微粒子 (以下、プローブ微粒子とも言う) は 1 つずつプローブアレー作成用の溝に供給される。検査用途に応じて、必要な種類のプローブを簡単に溝の中に並べることができる。各プローブを固定した微粒子の作製は安価にできるので、プローブアレー自身も安価に作ることができる。溝に並べられたプローブ付きの微粒子は検査用の毛細管、又は細い隙間のセルに入れられ、使用される。毛細管をプローブアレーホルダーに使用したときには、検査しようとする試料 DNA の量を少なくすることができる利点がある。また、溶液導入系との結合も簡単にできる利点

がある。

【0008】以下に本発明の構成の特徴の詳細を説明する。本発明の多項目検査を行なうプローブアレーの特徴は、(1)異なる検査対象(DNA又は蛋白等)とそれぞれ結合可能なプローブを固定した粒子を複数並べたこと、(1)に於いて、(2)各プローブを保持した粒子が予め決められた順序でライン状に並べられ、この順序又は並べられた位置と粒子に固定されたプローブの種類が対応づけられていること、(3)各プローブを保持した粒子は、粒子の持つ特徴とプローブの種類が対応づけられていることに特徴があり、(1)又は(3)に於いて、(4)各プローブを保持した粒子のサイズ又は形状と、粒子の表面に固定されたプローブの種類が対応づけられていること、(5)各プローブを保持した粒子は、保持したプローブの種類に応じて異なる色素又は蛍光体で標識されていること、(3)から(5)の何れかに於いて、(6)プローブを2次元平面上に1層に並べたこと、(7)プローブを1次元に並べたこと、(8)プローブを透明な窓を持つ容器内に保持したこと、

(1)から(5)の何れかに於いて、(9)プローブを保持した粒子を、毛細管内に保持したこと、(10)プローブを保持した粒子を、固体平面に形成された溝又は2枚の平面の間に形成された溝に保持されること、(11)プローブを保持した粒子を複数の毛細管内に保持した複数の毛細管を複数個並べるか、又はプローブを保持した粒子を平面に設けた溝に保持して、プローブを保持した粒子を2次元に配列したこと、(12)(1)から(7)の何れかに於いて、プローブを保持した粒子を、アガロース等のゲル状物質の中に保持したこと、等の特徴がある。本発明の多項目検査を行なうプローブアレーの製造方法の特徴は、(13)粒子の表面にプローブを固定する工程と、プローブが固定された複数の粒子を配列する工程とを有すること、(14)粒子の表面にプローブを固定する工程と、プローブが固定された複数の粒子を混合して平面上に配列する工程とを有し、粒子に固定されたプローブの種類を粒子の形状、サイズ、又は粒子を標識する蛍光体により識別すること、(15)(12)に於いて、粒子に固定されたプローブの種類により、予め定められた順序で粒子を直線上に並べること、(16)(14)に於いて、プローブを固定した粒子を、プローブの種類毎に異なる粒子溜に保持し、毛細管又は溝を通じて粒子を配列するための溝に1つつつ供給して配列させ、該配列を保持してプローブアレーホルダーに移送してプローブアレーを作成すること、(16)において、粒子溜から粒子を配列するための溝、又はプローブアレーホルダーへの移送を電気的な力により行なうこと、(18)粒子溜から粒子を配列するための溝、又はプローブアレーホルダーへの移送を溶液の流れを用いて行なうこと、(19)(14)から(17)の何れかに於いて、プローブを固定した粒子を移送するための

毛細管又は溝を複数個用いて、異なるプローブがそれぞれ固定された複数の粒子を同時に粒子を配列するための溝又はプローブアレーホルダーに移送すること、に特徴がある。

【0009】粒子の表面に保持されたプローブに結合する検査対象を検出する本発明の方法の特徴は、(20)検査対象を蛍光体又は燐光物質で標識する工程と、粒子に光(レーザー)を照射して発する蛍光又は燐光を光学的に検出する工程とを有すること、(20)に於いて、

(21)粒子が配列した直線に沿って、光(レーザー)を発する光源とアレーセンサーをスキャンして、粒子が配列する位置毎に蛍光又は燐光を検出すること、(22)粒子が配列した直線に沿って、光(レーザー)を照射して、粒子が配列する位置毎に蛍光又は燐光を検出し、各プローブに結合した検査対象の量を求めること、

(23)光の照射により得られる各粒子による光の散乱画像と、粒子に固定されたプローブに結合した検査対象から発する蛍光とを検出し、粒子の形状又は粒子を標識する蛍光体から発する蛍光と、検査対象から発する蛍光又は燐光の強度の関係を検出し、各プローブに結合した検査対象の量を求めること、(24)粒子をフローさせながら検出すること、(25)粒子に固定されたプローブに結合した検査対象を蛍光画像として計測すること、

(26)粒子を粒子画像として計測すること、等の特徴がある。本発明のプローブアレーの製造方法は、(27)粒子の表面にプローブを固定する第1の工程と、プローブが固定された複数の粒子を郡に分けて固体表面の各区画に配列する第2の工程と、各位区画に於いて粒子に固定されたプローブと検査対象とを反応させる第3の工程とを有し、第3の工程が行なわれる各区画での粒子の分布状態と、第1の工程での粒子の分布状態が異なることに特徴がある。

【0010】本発明の代表例を要約すると以下の通りである。本発明の代表例では、種々のプローブを固定した粒子(プローブ粒子)を一定の順序でホルダーに整列させたプローブアレーを用いる。各プローブ粒子を充填した細管又は溝を複数本並列に並べ、各細管又は溝から各々粒子の1個ずつを、他の細管又は溝に注入して、種々のプローブ粒子を常に一定の順序で整列させたプローブアレーを作成する。粒径の異なる粒子に多種のプローブを結合して、多種の蛍光標識DNAを同時計測する。本発明では、多種のDNAプローブを固定したプローブアレーが簡単に調製でき、任意のDNAプローブを多種固定した多種のDNA検出用のプローブアレーを提供する。

#### 【0011】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施例を図を参照して詳細に説明する。

【0012】(第1の実施例)図1は、本発明の第1の実施例のDNAプローブアレーの製作手順、DNAプロ

ーブアレーを用いる検査装置を示す図である。アビジン70を表面に保持した球形のプラスチック粒子1（直径0.2mm）を用意する。微粒子1の直径の精度は5%である。ビオチン付きのプライマーを用いてPCR増幅して得たDNAプローブを1本鎖とし、ビオチン71が結合されたDNAプローブ2と、アビジンを保持した微粒子（プローブ粒子）とを結合させる。このようにしてDNAプローブを種類毎に微粒子に捕獲し、複数のプローブが捕捉された微粒子3の群ができる。もちろんDNAプローブとして合成DNA鎖を用いても良く、この場合、ビオチン-アビジン結合でなく固体（微粒子）表面に直接DNAプローブを結合させる事もできる。固体表面にDNAプローブを結合させる方法は、例えば、上記した文献（*Biophysical Journal* 71, 1079-1086（1996）や*Analytical Biochemistry* 247, 96-101（1997））に記載がある。また、固体（微粒子）表面に全て同じ特定の配列、例えばTTTTT……TT等を固定しておき、ポリA鎖を持ったDNAオリゴマーをハイブリダイズさせ、相補鎖合成により、DNAオリゴマーを上記の特定の配列と結合させ固体（微粒子）表面に導入しても良い。

【0013】このようにして作成したプローブが捕捉された微粒子を1つつつ透明なキャピラリー管（プローブアレーホルダー7）の中に並べてプローブアレー4とする。キャピラリー管（プローブアレーホルダー7）の中に並べる順番から、並べられた何番目の微粒子がいかなる種類のプローブを表面に持つかを知ることができるので、DNAプローブ2と蛍光標識8が結合された試料DNAとをハイブリダイズした（9は相補鎖結合により微粒子1に捕捉された試料DNA断片である）後、光を照射して発する蛍光から検査体中のDNAの種類を知ることができる。

【0014】プローブ1、2、…、nからなるプローブアレー4を持つキャピラリー管（プローブアレーホルダー7）の試料注入口5の試料流入方向6から蛍光標識8が結合された試料DNAを注入してDNAプローブ2と蛍光標識8が結合された試料DNAとをハイブリダイズさせた後、プローブアレーホルダー7を検査装置の移動台（図示せず）にセットして、レーザー光源11からのレーザーをレンズ12で集光して移動するプローブアレーホルダー7に照射する。5”は、試料出口である。レーザーが照射された部位に存在する微粒子1に捕捉された蛍光標識8が結合された試料DNAから発する蛍光はフィルター12により波長選択され、CCDカメラ13等の光検出器により、レーザーの照射方向とほぼ直交する方向から検出される。検出された蛍光信号はモニター17にリアルタイムで表示されると共に、データ処理装置15に入力され所定の信号処理（蛍光強度の変化曲線の平滑化、ピークの位置及び強度の検出等）が施され

結果が表示装置16に出力される。モニター17に表示される出力図形の横軸は、キャピラリー管（プローブアレーホルダー7）の中に並べられた微粒子1の位置、従ってプローブの種類に対応し、縦軸は各プローブと相補鎖結合した試料DNA断片の存在を示す蛍光強度である。なお、コントローラー14は、上記の移動台の移動制御、CCDカメラ13からの信号取り込み制御、データ処理装置15、及びモニター17への信号伝送を制御する。モニター17、又は表示装置16での出力から、試料DNA（断片）に検査目的の塩基配列が存在するかどうか判定できる。

【0015】なお、上記の説明では、蛍光標識を試料DNA（断片）に結合したが、プローブ1、2、…、nのそれぞれ異なる蛍光標識を結合しておき、試料DNA（断片）に蛍光標識を結合しない構成としても良く、この場合フィルター12は、複数の波長帯域を選択できる多色フィルタの構成とするか、フィルター12の代わりに、分光結晶、回折格子等を使用して蛍光の分光を行なう構成とする。

【0016】次に、第1の実施例に於ける、微粒子をプローブ固定媒体とするプローブアレーの作製方法について説明する。

【0017】図2は、（a）微粒子をプローブ固定媒体とするプローブアレー作製治具の部品である細溝を持つプレートの平面図、（b）プローブアレー作製治具の断面図である。プローブ付き微粒子1は細溝を用いた微粒子配列用の治具により並べることができる。図2（a）の平面図に示す、微粒子配列用細溝治具の細溝を持つプレート18に、図2（b）の断面図に示す透明カバー23をつけて使用する。プレート18には、異なる種類のプローブを保持する微粒子をそれぞれ異なる溝に並べる複数の溝19と、溝19に交叉（直交）し、プローブを保持した種々の微粒子を配列するための溝（プローブアレー作製用細溝）20と、送液を排泄する送液出口用の溝21とが形成されている。溝19、20の溝幅方向及び溝深さの最大値は2つの微粒子が同じに入れない寸法（即ち、微粒子の直径をRとする時最大値を2R未満とする条件1を満たす）とし、溝21の溝幅方向及び溝深さの最大値は微粒子が通過できない寸法（即ち、微粒子の直径をRとする時最大値をR未満とする条件2を満たす）とする。即ち、プレート18に形成される細溝19、20と透明カバー23により形成される細管の内部を微粒子1は通過できる。なお、溝19、20、21の断面形状、寸法は、上記条件1、2を満たすものであれば、溝の断面形状は任意である。

【0018】細溝19の1つの溝には同一種類のプローブを保持する微粒子が、ランダムな間隔で並んでいる。細溝19の各細溝毎に異なるプローブを保持する微粒子が区分けして保持される。例えば、細溝19の第1の溝19-1にはプローブ1を保持する微粒子が、第2の溝

19-2にはプローブ2を保持する微粒子が、…、第nの溝19-nにはプローブnを保持する微粒子が、それぞれ並べられる。複数の溝19に直交して設けられた溝20にはプローブを保持した種々の微粒子が配列される。プローブ付き微粒子1は溶液の流れ、又は電界により配列用の溝20に導かれる。溝19には横方向には2つの微粒子はサイズの関係で入れないので、各種プローブを保持した微粒子（プローブ粒子）が1つつ複数の細溝19のアレーとプローブ配列用溝20との交点に並ぶ。この交点から先の溝21は細くなり粒子は先へ進めないようになっている。粒子の間隔はこの時点でまばら（ランダム）である。溝20に並んだ微粒子は、溝19と直行する方向、即ち配列用の溝20に沿って溶液流、又は電界によりプローブアレー保持キャピラリー（プローブアレーほるだー7）（内径0.3mm）に送り込まれ隙間無く配列する。22は、微粒子配列用の治具（23、20）とプローブアレーホルダー7とを結合するプローブアレーホルダーコネクターであり、5'はストッパーチューブである。細溝19の各溝に通じる粒子溜（図9の38参照）には、用いようとするDNAプローブを固定した粒子を供給しておく。このプローブを固定した粒子を保持する粒子溜の配列順序が、溝20、プローブアレー保持キャピラリーに於けるプローブの配列順序となる。プローブを固定する粒子の間にマーカーとなる粒子を入れて順序をわかりやすくすることもできる。

【0019】次に、第1の実施例に於ける、キャピラリー管中にプローブを保持するプローブアレーホルダー7の例について説明する。

【0020】図3は、第1の実施例に於けるプローブアレーホルダーの例を示す図である。プローブ付き微粒子は試料注入口、及び排出口のついたプローブアレーホルダー7（キャピラリー）に保持されている。プローブアレーホルダー7の両端には、微粒子1が流出しないようにストッパーチューブ5'、及びプローブアレーホルダーコネクター22を介してキャピラリーホルダー用末端アダプター24が取り付けられている。もちろんアダプター24は微粒子をキャピラリー（プローブアレーホルダー7）に導入してから取り付ける。

【0021】検査しようとするDNA試料を蛍光標識（ここでは、Cy-5（発光極大波長650nm）を用いた）し、溶媒と共にプローブアレーを保持するキャピラリー（プローブアレーホルダー7）中に導入し、ハイブリダイゼーションをDNA試料とプローブとの間で起こす。ハイブリダイゼーションにより目的DNAをプローブに結合した後、余剰のDNAサンプルを洗浄除去して蛍光検出をするが、ライン状のプローブアレーでは、プローブアレーを保持するプローブアレーホルダー7の機械的な走査が容易であり、試料の消耗が少ない利点がある。なお、標識蛍光体としてはテキサスレッド（発光極大波長：615nm）、フルオレセインイソチオシア

ネート（発光波長：520nm）等があり、これら標識蛍光体に加えて燐光を発する標識体を用いても良い。未反応のDNAを洗浄除去し、計測装置に挿入する。計測装置は励起用レーザー、及び蛍光検出器からなっている。キャピラリー管（プローブアレーホルダー）に沿ってレーザーをスキャンしたり、キャピラリー管の内側を管に沿ってレーザーを照射し多数の微粒子を同時に光照射し得られる蛍光画像を検出したりする。また、キャピラリー管を動かし微粒子を順次照射部へ送り込んでも良い。

【0022】次に、DNAプローブアレーを用いる検査装置の例について説明する。

【0023】図4は、ライン状プローブアレーと光源とを相対的にスキャンするDNAプローブアレーを用いる検査装置の例を示す模式図である。図4では、図1に示す構成と同様とし、レーザー照射位置と検出器13を相対的に固定し、レーザー照射位置と検出器13とを固定してプローブを保持したプローブアレーホルダー7を相対的に移動させて照射するか、又はプローブアレーホルダー7を固定してレーザー照射位置と検出器13を相対的に移動させて照射する方式とする。検出器13には光電子増倍管やレンズ付き冷却CCDカメラが用いられ、蛍光はレーザの照射方向とほぼ直交する方向から検出される。

【0024】図5は、レーザー光をライン状に配列した微粒子に沿って照射するDNAプローブアレーを用いる検査装置の例を示す模式図である。図5では、レーザー光源11からのレーザーをプローブアレーホルダー7の軸に沿って同軸方向に照射する例である。標識蛍光体から発する蛍光を、レーザーの照射方向と交叉する方向からマイクロレンズアレー（セルホックレンズ）25で集光し、フィルター26を介してラインセンサー27に結像させる。図5に示すその他の構成要素は、図1に示す構成と同様である。図5に示す構成は、効率の良い方法であるが微粒子が透明な場合に限られる。

【0025】図6は、プローブアレーの存在する領域（プローブの並ぶ照射領域）30の全体を全面照射するDNAプローブアレーを用いる検査装置の例を示す模式図である。図6に示す構成では、プローブアレーは1次元に配列しているが2次元に配列した場合にも適用できるように、冷却CCDエリアセンサー等を蛍光の検出に用いる。レーザー光源11からのレーザー光はミラー28で進行方向を変えてビームエクspander29によりレーザー光の照射領域を1次元方向に拡大して、プローブアレーホルダー7のうちプローブが並ぶ照射領域30の全体を全面照射する。CCDエリアセンサー等の2次元光検出器を使用する場合には、蛍光の2次元像が得られ、発光点の位置からプローブの種類がわかる。図6に示すその他の構成は基本的に図1と同様である。また、図6に於いて、更に、コンフォーカル顕微鏡、及び類似



技術を用いても良い。例えば、ビームエクspander 29を使用せず、ミラー28を回転させてレーザーの進行方向を変えてレーザースキャンを行ない、レーザーが照射されるプローブアレーホルダー7の部位に存在する標識蛍光体から発する蛍光を検出する構成とする。

【0026】図7は、微粒子型プローブアレーを使用する図6に示す構成により得られるモニター17に出力される結果の例を示す図である。図7に示す例では、蛍光発光を伴う微粒子（ターゲットDNAを保持微粒子）31を黒く表示した丸印、蛍光発光を伴わない微粒子（ターゲットDNAを保持しない微粒子）32を白く表示した丸印で示す。黒く表示された31のところが蛍光が強く、DNAがプローブに捕獲されている事が分かる。図6、図7に示す例では、蛍光体は1種類用いて試料DNAを標識したが、蛍光体を複数種用いて複数のDNAサンプルを標識して、比較計測しても良い。

【0027】以上説明したように、粒子に保持したDNAプローブを毛细管の中に保持すると、サンプル供給が容易で洗浄もやりやすい利点がある他、蛍光計測が簡単にでき、必要とする好みのプローブアレーを簡単に作ることができる。廉価な価格でプローブアレーを提供できる等の利点がある。また、ハイブリダイゼーションに要する試料体積も小さくできる。なお、第1の実施例では、複数のプローブの保持にキャピラリーを用いたが、透明な平板に設けた溝を用いても良い。粒子を溝に並べる場合、溝の底部にゲルを保持させておきプローブを保持した粒子を溝に配列後に、粒子をゲルに押し付けて固定しても良く、この場合、サンプル液を満たす空隙が小さくなりサンプル消耗を押さえることができる。溝を形成した透明な平板によりプローブアレーを構成する場合にも、図1、図4、図5、図6、図10（後述する）に示す検査装置の例が適用でき、プローブの捕捉された試料を蛍光により容易に検出が可能であることは言うまでもない。

【0028】（第2の実施例）第1の実施例ではプローブアレーを直線上に配置したが、第2の実施例では、プローブアレーを2次元的に配置する例を示す。第2の実施例で用いる微粒子は第1の実施例と同じ直径0.2mmの粒子であるが、直径が0.1mm、又は0.05mmの粒子を用いる時は、以下に述べる溝のピッチ、深さ、プローブアレーホルダーのサイズ等を変える必要がある。

【0029】プローブアレーを2次元的に配置する方法には、プローブアレーを保持したキャピラリー管を並べプローブアレーホルダーとするか、平板に複数の溝を形成し、透明カバーを取り付けプローブアレーホルダーとして活用する。キャピラリー管を並べプローブアレーホルダーとする場合の作製法は、第1の実施例と同じであり、単にキャピラリーを複数並べれば良い。但し、複数キャピラリーを平行に保持し、サンプルを供給したり、

洗浄液を送り込むためのハウジングはマルチキャピラリーであることに応じてかえる必要がある。また、レーザーを複数キャピラリーに照射する際に、複数キャピラリーの配列される平面に平行な方向からレーザービームを照射し、各キャピラリー内で発する蛍光を2次元検出器で検出するか、又は複数キャピラリーの配列される平面に対して、ビームエクspanderにより2次元に広げられたレーザーを照射して、各キャピラリー内で発する蛍光を2次元検出器で検出する構成とする。

【0030】以下の説明では、平板に複数の溝を形成したプローブアレーホルダーについて説明する。2次元プローブアレーホルダー34は透明な2枚の平板で挟まれた間隙0.1mmを持つセルからなっており、下面の平板には溝が設けられている。溝のピッチは0.3mm、溝の幅0.25mm、溝の深さは0.15mmであり、溝の幅、及び溝の深さは共に2個の粒子が通過するには小さく、1個の粒子が通過するのに十分である値とする。各溝にプローブを固定した微粒子を並べる。微粒子の直径サイズは0.2mmであり、微粒子は溝から溝へ移動する事はできない。

【0031】図8は、(a) 2次元プローブアレーホルダー34へ微粒子プローブを導入するための2次元プローブアレーを作製する治具33の平面図、(b) 断面図である。2次元プローブアレーホルダー34へ微粒子を並べるには図8(a)、(b)に示す、ガイドのプローブ供給用細溝36を利用する。溝36の開口部は透明カバー35で覆われている。図8(a)に示すように、溝36は末広になっており、溝36の広がった部分にプローブ付き微粒子1を、保持したプローブの種類により定められた順序で並べる。溝36のアレーに並べられたプローブ付きの微粒子1を溶媒の流れ、又は電界によって溝36の狭い部分（粒子保持部37）へ移動させて2次元プローブアレーホルダー34へ移送する。溝36にまばらに配置されていたプローブ付き微粒子は、図8

(b)に示す断面図に見られるように、2次元プローブアレーホルダー34に密集した状態で保持される。プローブアレーホルダー34には、図示しない、試料液、又は洗浄液を導入、及び排出できるように口が設けられている。溝36にプローブ付きの微粒子を並べるのは第1の実施例で用いたのと同様に、キャピラリーにまず微粒子を配列させ、微粒子を溝36に移送することで行なう。微粒子は溝36を超えて隣へ移動できないので、各列（溝）に属するプローブ粒子はその属するグループ毎に異なる列（溝）に配置される。各列（溝）のプローブの配列は第1の実施例と同様に定めることができる。次いで、微粒子は溝36からプローブ付き微粒子配列用細溝37に移送される。

【0032】蛍光を検出する検査装置は図6に示す装置を一部改良して、2次元プローブアレーホルダー34に図6に示すように1次元方向に拡大された線状のレーザ

一光を照射し、拡大方向と直交する方向に線状のレーザー光をスキャンすることで得られる 2 次元蛍光イメージを、2 次元検出器 (CCD 等) を使用して検出する。もちろん、点状に絞ったレーザーを 2 次元方向に走査して 2 次元蛍光画像を得ても良い。

【0033】 (第 3 の実施例) 本発明の方法では微粒子を簡便に並べる手法が 1 つのキーポイントである。第 3 の実施例では簡便に微粒子を並べプローブアレーを作製する例を示す。プローブアレーではプローブを保持した固体 (粒子) を密集して並べることが反応体積を小さくし、計測を容易にする上で重要である。一方、プローブアレーを製作する観点からはプローブを保持する部位がまばらな方が作りやすい。そこで、プローブを固定した部位を移動可能な構造にし、プローブアレーを作製後に密集構造とするというのが本発明のポイントである。即ち、本発明のポイントは、プローブを固定した固体 (粒子) を移動させるにより、プローブを固定した固体 (粒子) が密集したプローブアレーを作製する点にある。

【0034】 プローブの種類毎に固体表面に保持した微粒子 (プローブ粒子) を並べるには、微粒子を 1 つずつピンセット等によりプローブアレーホルダーの溝に配列させていく方法がある。この方法は、プローブを連続した固体表面に区画して付着させてプローブアレーを製作する時に用いる方法に類似している。このいわゆる *spotting* は、プローブの領域が細くなるにつれて困難になってくる。しかし、独立したプローブ付き微粒子を細かく並べるのは容易に可能である。例えば、プローブを固定した固体 (粒子) が密集したプローブアレーを製作するには、図 2 に示す溝 19、図 8 に示す溝 36 に、プローブ付き粒子をピンセット等を用いてまばらにまず置いてゆき、液流、又は電場等により粒子を移動させ密集状態にして、プローブアレーホルダー (7、34) 中に保持すれば良いのである。

【0035】 図 9 は、微粒子溜からプローブを保持した微粒子を配列用溝に導入する方法の 1 例を模式的に示す図である。図 9 に示すプローブアレーの作成方法は同一種類のプローブ付き微粒子を沢山保持した溜から微粒子を 1 つずつ配列用の溝に供給する方法である。図 9 では、微粒子 1 の溜 38 から細溝 (図 1 に示す 19) を通って配列用の溝 (図 1 に示す 20) へ微粒子を 1 つずつ溶液流を用いて供給し、微粒子をプローブアレーホルダー 7 に移送している。同様に、微粒子 1 の溜 38 から配列用の細溝 (図 8 に示す 36) へ微粒子を 1 つずつ溶液流を用いて供給し、微粒子をプローブアレーホルダー 34 に移送することもできる。なお、微粒子の溜 38 は溝 19 又は 36 が形成される平面に垂直に於いても、平面内に於いても良いが第 3 の実施例では平面に垂直とし、各粒子溜 38 が脱着可能である様にする使いが良い。即ち、目的に応じてプローブの種類をいくらでも変化するからである。

【0036】 (第 4 の実施例) 第 4 の実施例はプローブ付きの微粒子を予め配列させることなく用いる例である。第 1 から第 3 の実施例では、微粒子に保持したプローブの種類を微粒子の保持されている位置により識別したが、第 4 の実施例では、観測している微粒子の位置ではなく、微粒子それ自体の形状 (例えば、粒径)、誘電的性質、又は色によって識別する方法を開示する。即ち、プローブ上に捕獲された蛍光標識試料からの信号を得る際に、粒子の形状、色等を計測し表面のプローブの種類を同時に調べる方法である。また、試料を標識した蛍光体と異なる種類の蛍光体で粒子を標識しても良い。

【0037】 第 4 の実施例では、試料を長寿命の蛍光体、又は燐光を出す標識体で標識し、微粒子をそのサイズと微粒子を標識する蛍光体からの蛍光の違いで識別する例を示す。各粒子を識別する蛍光体には FITC、テキサスレッド、及び Cy-5 等の蛍光寿命の比較的短い蛍光体を用いる。粒子を蛍光寿命の比較的短い蛍光体で標識するのは、サンプルの標識に用いる蛍光寿命の長い蛍光体からの蛍光と、粒子を標識する蛍光体からの蛍光とを識別できるようにするためである。

【0038】 図 10 は、2 次元配列のプローブアレーを用いて多色検出により試料を検出する検査 (計測) 装置の構成を示す模式図である。図 10 では、複数のフィルターを用いた例を示した。最初にフラッシュライト 40 により、試料と反応済みのプローブ付き微粒子 1 が 2 次元配置されるプローブアレー 39 に光を照射して、プローブアレー 39 の透明な支持台を透過した光を、必要に応じて光減衰フィルタを通して CCD カメラ 13 により検出された信号をデータ処理装置 15 に入力し、プローブアレー 39 では、各粒子は重なり合わないことを確認し、粒子 (ビーズ) の形状を計測する。

【0039】 次いで、レーザー光源からのレーザー 11 を、第 1 の方向にレーザー光の走査を行なう回転するミラー 28 と、第 1 の方向に直交する第 2 の方向にレーザー光の照射領域を拡大するビームエクspander 29 とにより、プローブアレー 39 に照射する。スライド式又は回転式フィルターホルダー 41 に保持される複数の蛍光波長選別フィルター 42 をスライドさせ透過波長を変化させながら種々の波長の蛍光を選別した後、プローブアレー 39 から発する蛍光は、CCD カメラ 13 により検出される。コントローラー 14 は、カイテンミラーの制御、フラッシュライト 40 の制御、CCD カメラ 13 からの信号取り込み制御、データ処理装置 15、及びモニター 17 への信号伝送を制御する。モニター 17、又は表示装置 16 での出力から、試料 DNA (断片) に検査目的の塩基配列が存在するかが判定できる。

【0040】 第 4 の実施例では、2 種類の蛍光体の混合比率を変化させて微粒子の表面に固着し、この混合率を変化させることで、2 種類 1 組の蛍光体毎に微粒子を 20 個まで識別する。例えば、蛍光体 F1、F2 を使用

し、これら蛍光体 F1、F2 の混合率を (w1、w2) とする時、混合率 (w1、w2) を、(w1、w2) = (0、0.05)、(0.05、0.95)、(0.1、0.9)、(0.15、0.85)、(0.2、0.8)、(0.25、0.75)、(0.3、0.7)、(0.35、0.65)、(0.4、0.6)、(0.45、0.55)、(0.5、0.5)、(0.55、0.45)、(0.6、0.4)、(0.65、0.35)、(0.7、0.3)、(0.75、0.25)、(0.8、0.2)、(0.85、0.15)、(0.9、0.1)、(0.95、0.05)、(1.0、0) から 20 個選ぶ。一方、100  $\mu\text{m}$  から 7  $\mu\text{m}$  刻みで 198  $\mu\text{m}$  までの 15 種類の粒子のサイズをもつ粒子群を使用して、各粒子をサイズにより識別する。図 10 に示す計測装置では、微粒子のサイズと蛍光を計測するが、励起光はパルスで照射され、DNA を標識する標識からの寿命の長い燐光と粒子を標識する標識からの蛍光とは時間分解計測により区別して測定できる。この結果、合計、 $20 \times 15 = 300$  種類の DNA プローブ (粒子) を測時に識別する。計測装置としては、レーザースキャン型蛍光検出装置、又は受光波長選別型の冷却 CCD 等が用いられる。波長選別器としては回折格子、波長分散プリズム、又は複数のバンドパスフィルターから構成する分光システムを用いることができる。

【0041】測定される蛍光の相対強度から粒子の種類を識別するが、更に励起光 (レーザ) の波長を変化させることにより多くの同一粒径の粒子を識別できる。例えば、YAG レーザで励起できる蛍光体 Joe、Tamura を用いてこれら蛍光体の混合比を変化させて粒子を標識すると、これら蛍光体からの蛍光の最適受光チャンネルに合わせた 2 つのフィルターから得られる信号の強度比を 10 段階に分類して、約 10 種の粒子の識別が可能である。一方、Rox を更に使用して粒子を標識すると、(Joe、Tamura) の組合わせの混合比の 10 通りに加えて、(Joe、Rox) の組合わせの混合比の 10 通りの全部で 30 通りの同一粒径の識別が可能となる。更に、半導体レーザで励起できる長波長蛍光体を 5 種類を用いて試料を標識すると、150 種の試料を識別できる。更に、15 種類の粒径の粒子を使用するサイズ計測を組合せると、2250 種の DNA プローブを識別できる。各粒子は異なる DNA プローブを表面に保持しており、2250 種の DNA を識別検出できる。プローブを収納する容器を区分けしたり、上記で説明した粒子群を保持する部位 (区画) を複数持つ保持チップを用いると、各区分け部分 (区画) に異なる DNA プローブ群を保持した粒子を保持できるので、識別検出できる DNA の種類は 10000 種以上に容易にすることができる。

【0042】以上の説明では、蛍光を用いて粒子を標識

したが色素を用いても良い。プローブの種類は目的に応じて自由に変化させることができるので、種々の目的に合った多プローブセンサー素子を得ることができる。

【0043】なお、上記の Joe、Tamura、Rox はパーキンエルマー ABD 社の商標、テキサスレッドは molecular probe 社の商標、Cy-5 はアマシヤムフルマシア社の商標である。

#### 【0044】

【発明の効果】以上、説明したように本発明によれば、任意のプローブアレーを簡単に、安価に作成することができる。また、キャピラリー内にプローブアレーを構築することにより試薬量を低減し、試薬の注入、洗浄が容易なプローブを提供できる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の第 1 の実施例の DNA プローブアレーの製作手順、DNA プローブアレーを用いる検査装置を示す図。

【図 2】本発明の第 1 の実施例に於ける微粒子をプローブ固定媒体とするプローブアレー作製治具の (a) 部品である細溝を持つプレートの平面図、(b) プローブアレー作製治具の断面図。

【図 3】本発明の第 1 の実施例に於けるプローブアレーホルダーの例を示す図。

【図 4】本発明の第 1 の実施例に於ける、ライン状プローブアレーと光源とを相対的にスキャンする DNA プローブアレーを用いる検査装置の例を示す模式図。

【図 5】本発明の第 1 の実施例に於ける、レーザ光をライン状に配列した微粒子に沿って照射する DNA プローブアレーを用いる検査装置の例を示す模式図。

【図 6】本発明の第 1 の実施例に於ける、プローブアレーの存在する領域全体を全面照射する DNA プローブアレーを用いる検査装置の例を示す模式図。

【図 7】本発明の第 1 の実施例に於ける、微粒子型プローブアレーを使用する図 6 に示す構成により得られるモニターに出力される結果例を示す図。

【図 8】本発明の第 2 の実施例に於ける、(a) 2 次元プローブアレーホルダー 34 へ微粒子プローブを導入するための治具の平面図、(b) 断面図。

【図 9】本発明の第 3 の実施例に於ける、微粒子溜からプローブを保持した微粒子を配列用溝に導入する方法の 1 例を模式的に示す図。

【図 10】本発明の第 4 の実施例に於ける、2 次元配列のプローブアレーを用いて多色検出により試料を検出する検査装置の構成を示す模式図。

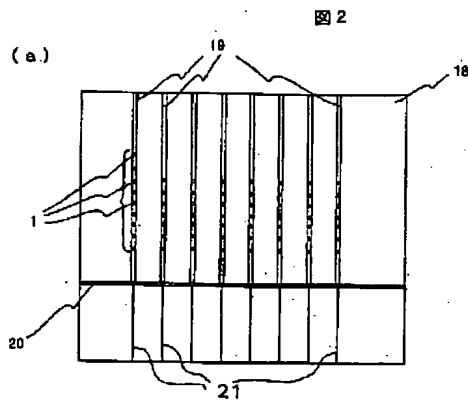
#### 【符号の説明】

1…微粒子、2…DNA プローブ、3…プローブ付き微粒子、4…プローブアレー、5…試料注入口、5'…ストッパーチューブ、5''…試料出口、6…試料の流入方向、7…プローブアレーホルダー、8…蛍光標識、9…捕獲された試料 DNA 断片、10…レンズ、11…レー

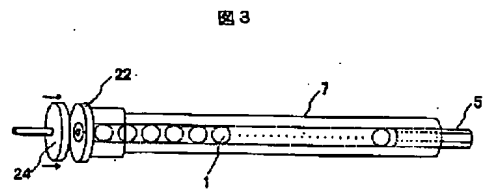
ザー光源、12…フィルター、13…CCDカメラ、14…コントローラー、15…データ処理装置、16…表示装置、17…モニター、18…微粒子配列用細溝治具の細溝を持つプレート、19…微粒子ホールド用細溝、20…プローブアレー作製用細溝、21…送液出口用の溝、22…プローブアレーホルダーコネクタ、23…透明カバー、24…キャピラリーホルダー用末端アダプター、25…マイクロレンズアレー（セルホックレンズ）、26…フィルター、27…ラインセンサー（CCDラインセンサー）、28…ミラー、29…ビームエクスペンダー、30…プローブの並ぶ照射領域、31…

蛍光発光を伴う微粒子（ターゲットDNAを保持微粒子）、32…蛍光発光を伴わない微粒子（ターゲットDNAを保持しない微粒子）、33…2次元プローブアレーを作製する治具、34…2次元プローブアレーホルダー、35…透明カバー、36…プローブ供給用細溝、37…プローブ付き微粒子配列用細溝、38…プローブ付き微粒子溜、39…プローブ付き微粒子を2次元配置したプローブアレー、40…ランプ、41…スライド式フィルターホルダー、42…蛍光波長選別フィルター、70…アビジン、71…ビオチン。

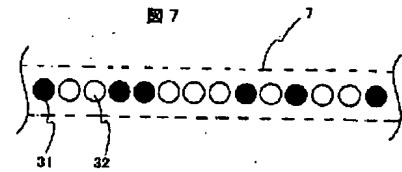
【図2】



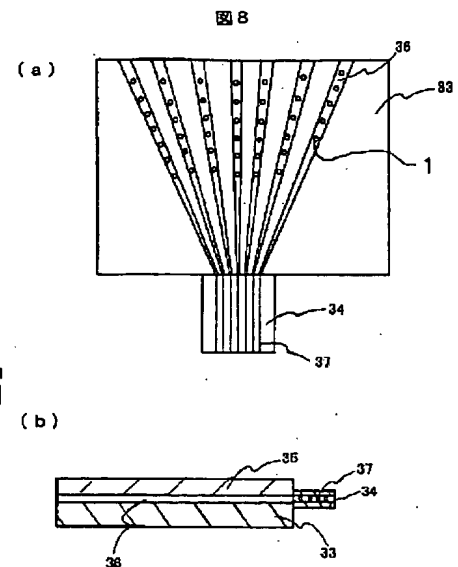
【図3】



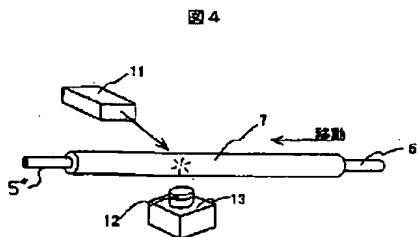
【図7】



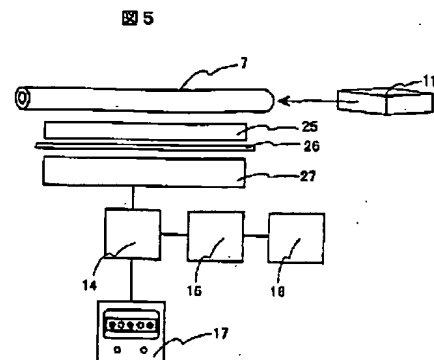
【図8】



【図4】

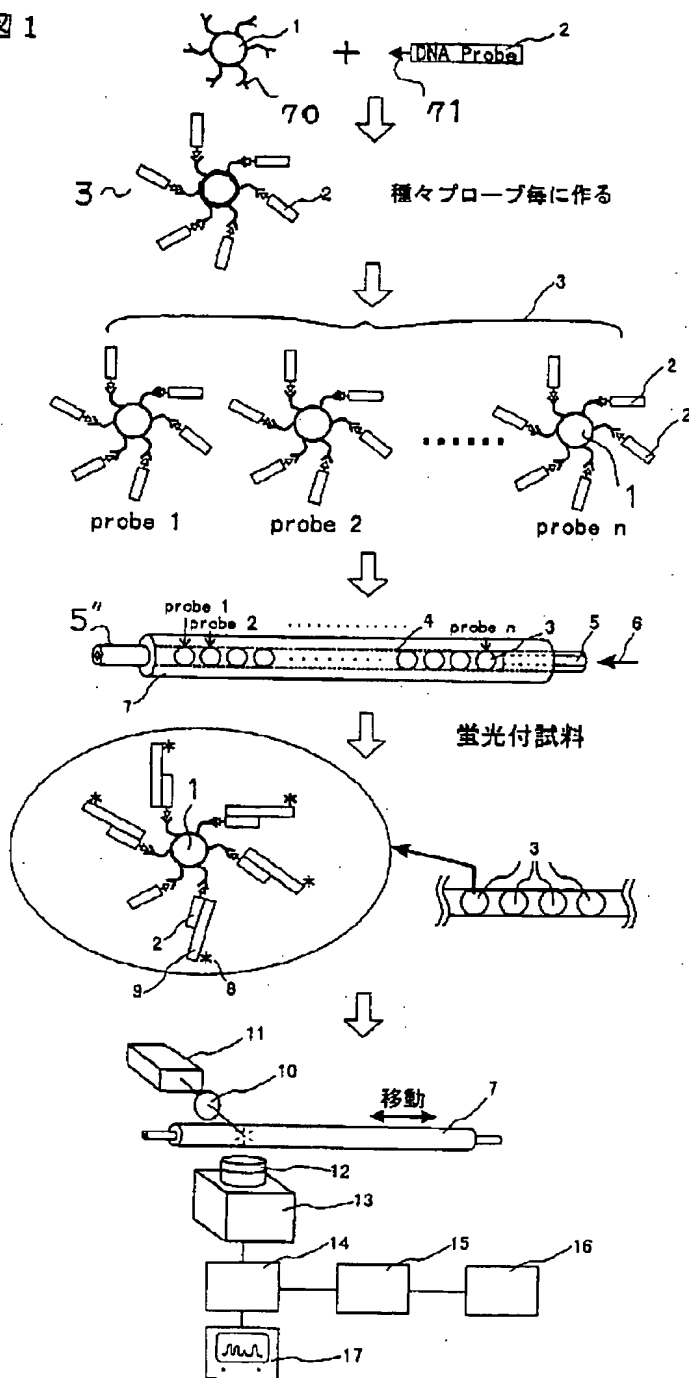


【図5】



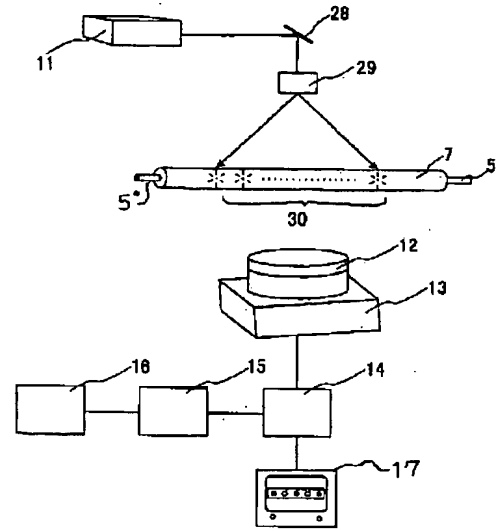
【図 1】

図 1



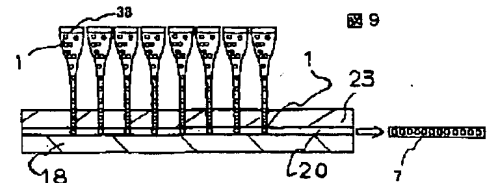
【図 6】

図 6



【図 9】

図 9



【図 10】

図 10

